

CHRONISCHE TOXIZITÄT VON
GUANIDINBERNSTEINSÄURE
BEI KANINCHEN

Charlotte Pfadler

1972

CHRONISCHE TOXIZITÄT VON
GUANIDINBERNSTEINSÄURE
BEI KANINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Charlotte Pfadler

aus München

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. -Doz. Dr. H. DOBBELSTEIN
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. SCHWIEGK
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1972



INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	7
2.	MATERIAL UND METHODIK	9
2.1.	Versuchstiere	9
2.2.	Herstellung und Applikation der GBS- und Kontrollinjektionslösung	9
2.3.	GBS-Bestimmung im Kaninchenserum und Kaninchenurin	10
2.3.1.	Säulenchromatographische BGS-Trennung	10
2.3.1.1.	Elution von GBS aus dem Serum und Urin der Kaninchen	10
2.3.1.2.	Quantitative Bestimmung von GBS im Eluat	11
2.4.	Messung der Nervenleitgeschwindigkeit	12
2.5.	Weitere Einzeluntersuchungen	13
2.6.	Chronischer Intoxikationsversuch mit GBS bei Kaninchen	14
2.6.1.	Versuche zur Bestimmung der Intoxikationsdosis	14
2.6.2.	Durchführung der chronischen Intoxikation	14
2.6.3.	Untersuchungen während der chronischen Intoxikation	15
2.6.4.	Kontrollversuch	15
3.	ERGEBNISSE	16
3.1.	Resorption und Exkretion von GBS nach oraler Gabe bzw. subkutaner Injektion	16
3.2.	Chronischer Intoxikationsversuch mit GBS	16
3.2.1.	Nervenleitgeschwindigkeit	16
3.2.2.	Herzveränderungen	17
3.2.3.	Blut	20
3.2.4.	Leber	20
3.2.5.	Niere	20
3.2.6.	Stoffwechsel	22
3.2.7.	Allgemeinzustand	22

4.	DISKUSSION	23
4.1.	Bemerkungen zur Methode und zur Versuchsdurchführung	23
4.1.1.	Bestimmung von GBS	23
4.1.2.	Klinischer Ausgangspunkt der Intoxikation mit GBS	23
4.2.	Chronischer Intoxikationsversuch mit GBS bei Kaninchen und Pathogenese urämischer Symptome	23
4.2.1.	GBS und Anämie bei Urämie	23
4.2.2.	GBS und hämorrhagische Diathese	24
4.2.3.	GBS und periphere Neuropathie bei Urämie	24
4.2.4.	Stoffwechselveränderungen durch GBS in ihrer pathogenetischen Bedeutung für die Urämie	26
4.2.4.1.	Erhöhung der Lactatkonzentration	26
4.2.4.2.	Erniedrigung der Harnsäurekonzentration	27
4.2.5.	GBS und Nephrotoxizität bei Urämie	27
4.2.6.	Abschliessende Bemerkung	27
4.3.	Chronische Toxizität von GBS bei Kaninchen im Vergleich zu anderen Guanidinverbindungen	28
4.3.1.	Allgemeine Aussagen zum Toxizitätsvergleich	28
4.3.1.1.	"Entgiftung" von GBS durch die Molekülstruktur	28
4.3.1.2.	Pharmakologische Wirkung der GBS durch die Guanidinogruppe	29
4.3.2.	Spezielle pharmakologische Wirkungen von GBS im chronischen Intoxikationsversuch bei Kaninchen im Vergleich mit anderen Guanidin-derivaten	29
4.3.2.1.	GBS und Blutzuckerspiegel	29
4.3.2.2.	GBS und Herzfrequenz	29
4.3.2.3.	GBS und Nephrotoxizität	30
4.3.2.4.	GBS und oxadative Phosphorylierung	30
4.3.2.5.	GBS und Lactatspiegel	31
4.3.2.6.	GBS und Harnsäurespiegel	31
4.3.2.7.	GBS und Nervenleitgeschwindigkeit	32
4.3.2.8.	GBS und Anämie	32
4.4.	Allgemeine Diskussion	32
5.	ZUSAMMENFASSUNG	33

6.	ANHANG	34
7.	LITERATURVERZEICHNIS	35
8.	LEBENS LAUF	41

I. EINLEITUNG

Bei Guanidinvergiftung im Tierexperiment (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9) kommt es zu einem Symptomenkomplex, der dem klinischen Krankheitsbild der Urämie sehr ähnlich ist (1, 2, 3, 4). Eine endogene Guanidinvergiftung bei Urämie vermuteten Myers und Fine (5) bereits 1914, da sie eine Umwandlung des bei Niereninsuffizienz retinierten Kreatinins in Methylguanidin, eine äusserst toxische Substanz (z.B. 4, 10), für möglich hielten. Nichtspezifische chemische Bestimmungsmethoden (10) liessen jedoch alle Bemühungen scheitern, diese Substanzen im Blut oder Urin niereninsuffizienter Patienten mit Sicherheit nachzuweisen (11, 12, 2).

Bei der Auftrennung bekannter Guanidinverbindungen im Urin (Arginin, Guanidinoessigsäure, Kreatin und Kreatinin) wurde 1963 von Natelson und Mitarb. (13, 14) ein bisher unbekanntes Guanidinderivat im Urin niereninsuffizienter Patienten entdeckt und als Guanidinbernsteinsäure (GBS) identifiziert (Abb. 1). 1969 konnten Cohen, Stein und Mitarb. (15) eine säulenchromatographische Bestimmungsmethode entwickeln, mit der GBS im Serum, liquor cerebrospinalis und im Urin bei Urämie qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden kann. Dieser "Befund eines neuen N-Metaboliten bei Urämie" (15), der noch dazu eine Guanidinverbindung ist, veranlasste diese Autoren in GBS "a primary candidate for an uremic toxin" (16) zu sehen. In vitro Versuche mit GBS von Giovannetti (17), Horowitz (18) und Lonergan (19) deuteten ebenfalls auf eine Toxizität von GBS hin.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, im Tierversuch an Kaninchen durch eine chronische Intoxikation mit zur Klärung der Frage beizutragen, ob GBS zur Entstehung urämischer Symptome führt. Dabei wird auf Störungen im peripheren Nervensystem, wie sie bei Urämie bekannt sind (20), besonders geachtet.

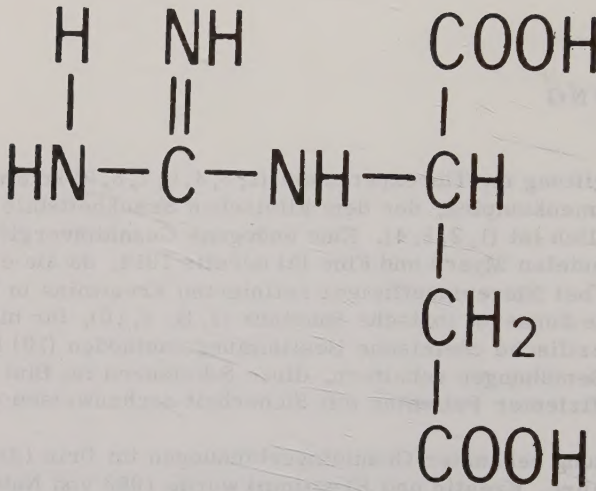


ABBILDUNG 1

Strukturformel von Guanidinbernsteinsäure

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden 18 junge Stallhasen mit einem Anfangsgewicht zwischen 2600 und 3700 g verwendet. Kaninchen wurden deshalb gewählt, weil sie sich gut zur wiederholten Messung der Nervenleitgeschwindigkeit eignen (s. 2.4.).

Die Tiere erhielten Altrumin Standardfutter und Wasser ad. lib. und waren z. T. in Stoffwechselkäfigen untergebracht.

2.2. HERSTELLUNG UND APPLIKATION DER GBS- UND KONTROLLINJEKTIONS-LÖSUNG

Die chronische Intoxikation der Versuchstiere wurde mit synthetischer Guanidinbernsteinsäure p. a. (Fa. Schuchardt, München) durchgeführt. GBS musste den Kaninchen wegen ungenügender Resorption parenteral gegeben werden (s. 3.1.). Die Injektionslösung zur subkutanen Injektion wurde wie folgt hergestellt:

Eine wässrige GBS-Lösung mit einer Konzentration von 500 (1000) mg% wurde angesetzt und mit 10 %iger Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt, danach NaCl zugegeben, um eine isotone Lösung zu erhalten. Da GBS bei 55°C zerfällt, ist eine Sterilisation der Lösung durch Erhitzen nicht möglich. Daher wurde die Injektionslösung durch Bakterienfilter steril und pyrogenfrei in Infusionsflaschen abgefüllt.

Für den Kontrollversuch wurde 0,5 %ige NaCl-Lösung ad inject. verwendet, entsprechend dem Kochsalzzusatz der GBS-Lösung. Die subkutane Injektion sowohl der GBS-Lösung wie auch der Kontrollinjektionslösung erfolgte am Rücken, Hinterteil und seitlich am Thorax der Tiere mit Einmalnadeln.

2.3. GBS-BESTIMMUNG IM KANINCHENSERUM UND KANINCHENURIN

2.3.1. Säulenchromatographische GBS-Trennung

Die Bestimmung der Guanidinbernsteinsäure im Urin und Serum der Kaninchen erfolgte mit der säulenchromatographischen Methode für GBS von Stein, Cohen und Mitarb. (15). Bei dieser Methode wird GBS durch das Anionenaustauscharz Dowex-1X8 isoliert und im Eluat mit einer modifizierten Sakaguchireaktion photometrisch quantitativ bestimmt. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

2.3.1.1. Elution von GBS aus dem Serum und Urin der Kaninchen

Etwa 200 g (ca. 20 g je Chromatographiesäule) des Ionenaustauscharzes Dowex-1X8, Vernetzungsgrad 200-400 mesh, mit dem Reinheitsgrad p.a. (Fa. Serva, Heidelberg) wurden mit 1/10 normaler Salzsäure zu einer dickflüssigen Suspension angeführt und in eine 2 Liter Glasfritte gegossen. Zur Umwandlung der Chloridform in die Acetatform wurde das Harz zuerst mit 10 %iger Natronlauge, dann mit dest. Wasser und anschliessend mit der 5 bis 6-fachen Menge 10 %iger Essigsäure solange gewaschen, bis jeweils die abtropfende Lösung den gleichen pH-Wert erreichte, wie die zugegebene Lösung. Mit dest. Wasser wurde wieder bis zur neutralen Reaktion gewaschen und darauf mit 3 molarer Natriumacetatlösung und zuletzt mit 0,1 molarer Essigsäure äquilibriert (pH-Wert mit pH-Meter).

Die Harzsuspension wurde in eine Chromatographiesäule mit 30 cm Höhe und 1 cm Durchmesser eingeschlämmt, anschliessend mit Dowexsäule auf eine Höhe von 25 cm eingestellt und nochmals mit 100 ml 0,1 molarer Essigsäure äquilibriert.

5-10 ml Kaninchenserum ⁺) oder 10 ml Kaninchenurin ⁺)

+) Den Versuchstieren wurde nach Desinfektion mit Alkohol und Stauen durch Abdrücken eine Ohrvene mit einer Rasierklinge inzidiert und das frei tropfende Blut aufgefangen, das anschliessend 10 min lang bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert wurde. Das Serum (jeweils 5-10 ml) wurde dann bis zur GBS-Bestimmung im Eisschrank aufbewahrt. Der 24-Stunden-Urin der Tiere wurde gesammelt und durch den Zusatz weniger Körnchen Cialit oder ein paar Tropfen Eisessig vor Bakterienwachstum geschützt. (Volumenbestimmung und Aufbewahrung von 10 ml im Eisschrank)

wurden mit einer Pipette auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Nachdem das Serum (Urin) eingesickert war, erfolgte die Elution mit 0,1 molarem Essigsäurepuffer. Dieses Eluat wurde verworfen. Darauf wurde mit 100 ml 0,25 molarer Essigsäure eluiert. Das Eluat wurde in 5 ml Fraktionen mit dem automatischen Fraktionssammler LBK UltraRac^R unter Volumenkontrolle aufgefangen und bis zur Weiterbearbeitung in den Eisschrank gestellt (Dauer eines gesamten Durchlaufs 2-4 Stunden).

2.3.1.2. Quantitative Bestimmung von GBS im Eluat

Folgende Reagenzien wurden benützt:

- GBS-Eichlösungen von 0,5, 1, 0, 1,5 und 2 mg%
0,04 g%ige 1-Naphthollösung (Reinheitsgrad p. a. ;
Lösungsmittel: absoluter Alkohol; Aufbewahrung im
Eisschrank in einer braunen Flasche)
- 2 g%ige Thyminlösung (Lösungsmittel: 10 %ige Natronlauge)
- 0,26 g%ige Natriumhypochloritlösung,
- 2 g%ige Natriumthiosulfatlösung.

Verwendet wurden weiter ein Photometer der Fa. Hitachi und Marburgpipetten.

Farbentwicklung und Extinktionsmessung (15):

0,5 ml 10 %iger Natronlauge wurden in Reagenzgläsern vorgelegt und 2 ml der Eluatfraktion zugegeben. Für den Nullwert wurden statt des Eluats 2 ml 0,25 molare Essigsäure und zur Ermittlung der Eichkurve 2 ml der GBS-Eichlösungen verwendet. Im Eisbad wurde in die Reagenzgläser 0,5 ml eisgekühlte 1-Naphthol/Thymin-Lösung (Verhältnis 1 : 1) unter Schütteln einpipettiert. Dann wurden 2 ml ebenfalls gekühlter Natriumhypochloritlösung und nach 60 sec 0,5 ml Natriumthiosulfatlösung zugegeben. Nach 10 min wurde dann bei einer Lichtwellenlänge von 515μ die Extinktion mit dem Photometer bestimmt. Aus den Extinktionswerten der Eichlösungen wurde eine Eichgerade nach dem Ausgleichsverfahren berechnet (s. auch Abb. 7). Mit dieser Eichgeraden wurden die GBS-Konzentrationen im Eluat ermittelt und daraus die GBS-Konzentration von Serum und Urin errechnet (Tischcomputer Olivetti, Programma).

2.4. MESSUNG DER NERVENLEITGESCHWINDIGKEIT (NLG)

Die Messung der NLG erfolgte mit der von Dobbelsstein speziell für Kaninchen entwickelten Methode (21):

Den Tieren wird noch im Käfig zur Beruhigung das Phenothiazinderivat Combelen ^R 0,3 mg/kg Körpergewicht (KG) subkutan injiziert. Nach einer halben Stunde leichte Narkose auf dem Versuchstisch mit Pentobarbital Nembutal ^R 8 mg/kg KG intravenös. Zur NLG-Messung wurde ein DISA-Einkanalelektromyograph 14 A 10 verwendet. Sterile Insektennadeln dienen als Elektroden. Die Reizelektroden sind bis auf die Spitze mit Teflon isoliert. An einem Hinterlauf werden proximal der n. ischiadicus und distal der n. tibialis gereizt und das an der Hinterpfote entstehende Summenaktionspotential des I. Interdigitalmuskels abgeleitet. Bei supramaximaler Reizung (Rechteckreize von 0,5 msec Dauer) wird dann die proximale bzw. die distale motorische Latenz gemessen. Unter motorischer Latenz ist die Zeit vom ausgelösten Reiz bis zum Beginn des Muskelaktionspotentials zu verstehen. Gereizt wurde der n. ischiadicus bei seinem Austritt aus dem foramen ischiadicum, indem die Reizelektroden in der Mitte zwischen getastetem trochanter mayor und Dornfortsatzreihe eingestochen wurden. Der n. tibialis wurde seitlich unter der Achillessehne gereizt. Der Abstand der markierten Einstichstellen von proximal nach distal wird bei ausgestrecktem Hinterlauf gemessen. Die motorische Nervenleitgeschwindigkeit (NLG_{mot}) ergibt sich dann aus folgender Formel:

$$\text{NLG}_{\text{mot}} = \frac{\text{Abstand der Reizpunkte}}{\text{proximale mot. Latenz} - \text{distale mot. Latenz}} \left[\frac{\text{m}}{\text{sec}} \right]$$

Weiter wurden auch die sensiblen Muskelafferenzen geprüft. Dazu wird die sensible Latenz, d.h. die Zeit vom ausgelösten Reiz bis zum Auftreten des H-Reflexpotentials des Muskels durch den Eigenreflexbogen sowohl distal als auch proximal wie die motorische Latenz gemessen.

Zuletzt wird an den proximalen und distalen Reizpunkten die Hauttemperatur mit einem Hautthermometer (Fa. Braun) überprüft.

2.5. WEITERE EINZELUNTERSUCHUNGEN

Elektrokardiogramm

Das Extremitäten-EKG der Versuchstiere wurde mit dem Siemens Cardiomat aufgezeichnet. Um den elektrischen Widerstand des Fells auszuschalten, wurde mit sterilen Luerlocknadeln V2A als Elektroden subkutan abgeleitet.

Röntgenuntersuchungen

Zur Bestimmung der Herzgrösse wurden Thoraxübersichtsaufnahmen der Versuchstiere in Bauchlage gemacht. Auch die Lage der Reizelektroden am n. ischiadicus wurde durch weitere Röntgenaufnahmen überprüft. Es wurde mit einem Röntgengerät der Fa. Siemens, einem Fokus-Film-Abstand von 1,35 m und 70-75 KV geröntgt.

Hämoglobinkonzentration und Erythrozytenzahl

Hämoglobinkonzentration und Erythrozytenzahl wurden mit dem Coulter Counter Modell B bestimmt.

Stoffwechseluntersuchungen

Blutglukose, Harnstoff-Stickstoff und Kreatinin wurden im Technikon-Autoanalyser bestimmt; Glukose mit der Ortho-Toluidin-Methode, Harnstoff-Stickstoff mit der Diacetylmonoxim-Methode und Kreatinin nach Jaffé.

Die Harnsäurekonzentration im Kaninchenserum wurde nach der Methode von Foli-Denis photometrisch, die Transaminasen SGOT und SGPT mit Hilfe der Boehringer-Test-Kombination und Lactat, β -Hydroxy-Butyrat, Pyruvat und Azetoazetat wurden nach den von Hohorst, Williamson und Geerken angegebenen Methoden in der Modifikation von Grunst (26) bestimmt.

Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Anschliessend an die chronische Intoxikation mit GBS wurden die Versuchstiere getötet. Die Sektion, wie auch die Erstellung und Beurteilung der histologischen Präparate von Herz und Nieren erfolgte am tierpathologischen Institut der Universität München, Prof. Dahme.

2.6. CHRONISCHER INTOXIKATIONSVERSUCH MIT GBS BEI KANINCHEN

2.6.1. Versuche zur Bestimmung der Intoxikationsdosis

Natürliches Vorkommen von GBS bei Kaninchen
Bei sechs nicht vorbehandelten Versuchstieren wurden Serum und Urin auf GBS untersucht. Es konnte keine GBS festgestellt werden. Eine natürlicherweise vorhandene Konzentration von GBS liegt deshalb unter der Nachweisgrenze der Methode (0.15 mg% (15)) und wurde in den Intoxikationsversuchen vernachlässigt.

Orale Zufuhr von GBS bei Kaninchen

Zwei Kaninchen nahmen fünf Tage lang ungefähr 150 mg GBS pro Tag mit dem Trinkwasser auf. Die Konzentration von GBS im Serum wie auch die Ausscheidung im Urin wurden laufend gemessen.

Subkutane Injektion von GBS bei Kaninchen

Mehrere Kaninchen erhielten gleichzeitig 17 mg GBS/kg KG subkutan (GBS-Injektionslösung s. 2.2.). Anschliessend wurde der Verlauf der GBS-Serumkonzentration dieser Kaninchen bestimmt, wobei 1/2, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden nach der Injektion jeweils verschiedenen Tieren Blut abgenommen wurde (s. auch Abb.2).

2.6.2. Durchführung der chronischen Intoxikation

Soll eine mittlere GBS-Konzentration im Serum von 3 mg% über längere Zeit hinweg aufrechterhalten werden, so ist alle 4-5 Stunden eine erneute subkutane Injektion nötig (s. Abb.2 und 4.1.2). Daher wurde im chronischen Intoxikationsversuch sechs Kaninchen alle 4-5 Stunden eine Dosis von 17 mg/kg KG vier Wochen lang injiziert. Während weiterer fünf Wochen erfolgten die Injektionen alle 3-4 Stunden mit einer Nachtpause von 9 Stunden. Die Tagesgesamtdosis blieb konstant, da die letzte Einzeldosis vor der Nachtruhe entsprechend erhöht wurde. Der chronische Intoxikationsversuch dauerte damit insgesamt 9 Wochen. In dieser Zeit wurde die GBS-Konzentration im Serum laufend kontrolliert und die GBS-Ausscheidung im Urin mehrmals bestimmt.

2.6.3. Untersuchungen während der chronischen Intoxikation

Einmal wöchentlich wurden bei den Versuchstieren die motorische Nervenleitgeschwindigkeit am n.ischiadicus bzw. am n.tibialis wie auch die sensiblen Latenzen bestimmt. Mehrere Kontrollmessungen fanden bei denselben Versuchstieren vor Beginn der Intoxikation statt. Die folgenden Untersuchungen wurden während des chronischen Intoxikationsversuches wiederholt durchgeführt:

EKG der Versuchstiere;

Röntgen des Kaninchenthorax zur Bestimmung der Herzgrösse;

Bestimmung der Erythrozytenzahl und der Hämoglobinkonzentration;

Bestimmung der Transaminasen SGOT und SGPT, von Harnstoff-Stickstoff, Kreatinin und von Harnsäure im Kaninchenserum;

Messung der Konzentration von Laktat, Pyruvat, β -Hydroxybutyrat und Azetoazetat im Kaninchenblut.

Zusätzlich wurden die Tiere wöchentlich gewogen.

2.6.4. Kontrollversuch

Anschliessend an den chronischen Intoxikationsversuch wurde ein Kontrollversuch mit 12 Kaninchen (Kontrolltiere) durchgeführt, die das gleiche Ausgangsgewicht wie die mit GBS behandelten Tiere (Versuchstiere) hatten.

Sechs Kontrollkaninchen erhielten 9 Wochen lang die gleichen Volumina an NaCl-Lösung pro kg KG wie die Versuchstiere subkutan injiziert. Die Menge war auf täglich drei gleich grosse Injektionen verteilt. Die NaCl-Konzentration entsprach der bei den Versuchstieren. Die übrigen sechs Kaninchen erhielten keine Injektionen.

3. ERGEBNISSE

Die meisten Messwerte wurden statistisch ausgewertet, wobei den gewonnenen Daten eine Studentverteilung zugrunde gelegt wurde (22). Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird im folgenden durch p angegeben.

3.1. RESORPTION UND EXKRETION VON GBS NACH ORALER GABE UND SUBKUTANER INJEKTION

Bei oraler Zufuhr von 150 mg GBS pro die konnten bei den Versuchstieren keine Vergiftungserscheinungen beobachtet werden. Ebenso verlief ein Nachweis von GBS im Serum der Tiere negativ. Im 24-Stunden-Urin wurde nur etwa $1/30$ der angegebenen Dosis wiedergefunden. Die Resorption von GBS im Magen-Darmtrakt von Kaninchen ist also gering.

Bei subkutaner Injektion von 17 mg GBS/kg KG (s. Abb.2) steigt die Konzentration von GBS im Serum innerhalb einer Stunde auf einen Höchstwert von 6 mg% an. Anschliessend sinkt die Konzentration in 4-5 Stunden auf den Anfangswert Null ab. Wie man aus Abbildung 2 erkennt, liegt der mittlere Serumspiegel bei 3 mg%. Bei wiederholten Messungen kommt es weder zu einer Kumulation im noch zu einer schnelleren Elimination aus dem Serum, wie Kontrollmessungen während des Intoxikationsversuches ergaben. Im 24-Stunden-Urin wurden ungefähr 85 % der subkutan injizierten Menge ausgeschieden.

3.2. CHRONISCHER INTOXIKATIONSVERSUCH MIT GBS

3.2.1. Nervenleitgeschwindigkeit

Während der neunwöchigen Intoxikation mit GBS blieb, wie aus Abb.3 und 4 (22) hervorgeht, die motorische Latenz sowohl proximal als auch distal und entsprechend die motorische Nervenleitgeschwindigkeit des n.ischiadicus bzw. des n.tibialis konstant. Dasselbe Ergebnis hatte auch die Messung der sensiblen Latenzen.

3.2.2. Herzveränderungen

Wie Abb. 5 zeigt (22), veränderte sich die Herzfrequenz im Kontrollversuch mit und ohne NaCl-Injektionen nicht, nahm jedoch im Verlauf des Intoxikationsversuches signifikant ($p < 0,05$) um etwa 27 % des Wertes bei Versuchsbeginn ab. Röntgenuntersuchung und Sektion zeigten keine Änderung der Herzgrösse. Der Herzmuskel war patho-histologisch ohne Befund.

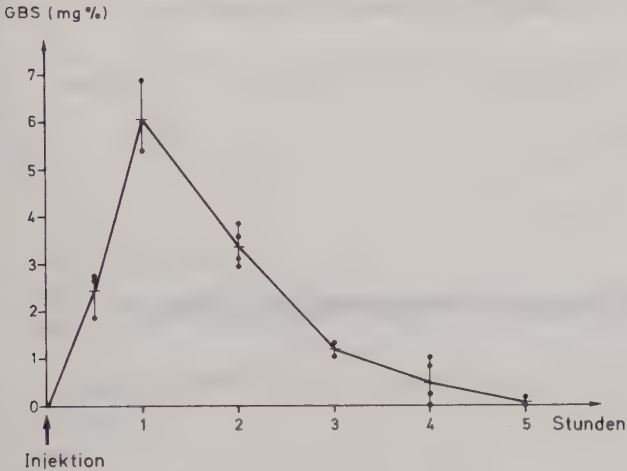


ABBILDUNG 2

GBS-Serumkonzentration bei Kaninchen nach s.c. Injektion von 17 mg GBS/kg KG (22)

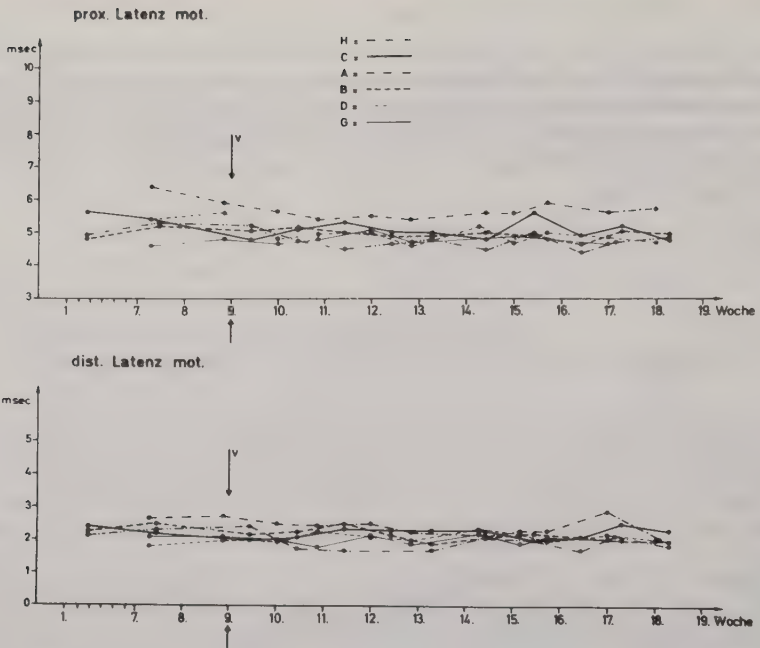


ABBILDUNG 3

Motorische Latenz proximal und distal vor und während der Intoxikation bei 6 Versuchstieren (H, C, A, B, D, G); (V = Intoxikationsbeginn)

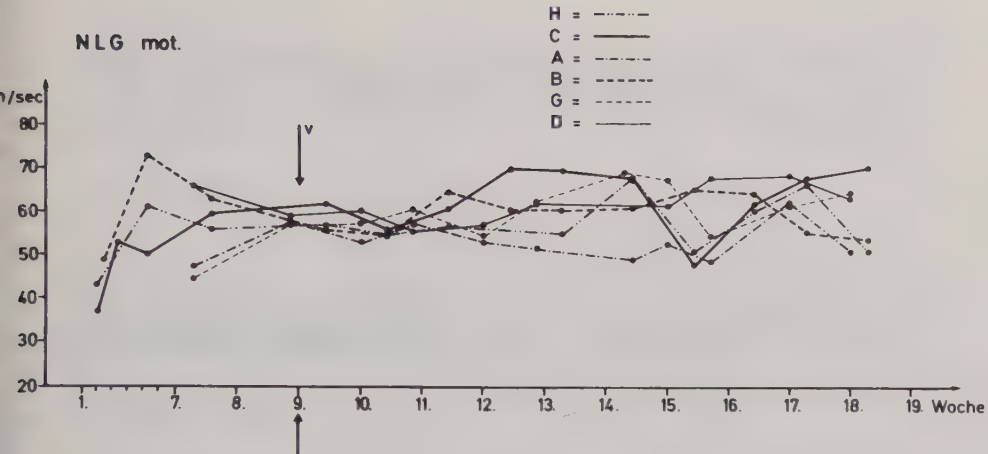


ABBILDUNG 4

Motorische Nervenleitgeschwindigkeit vor und während der Intoxikation (s. Abb. 3)

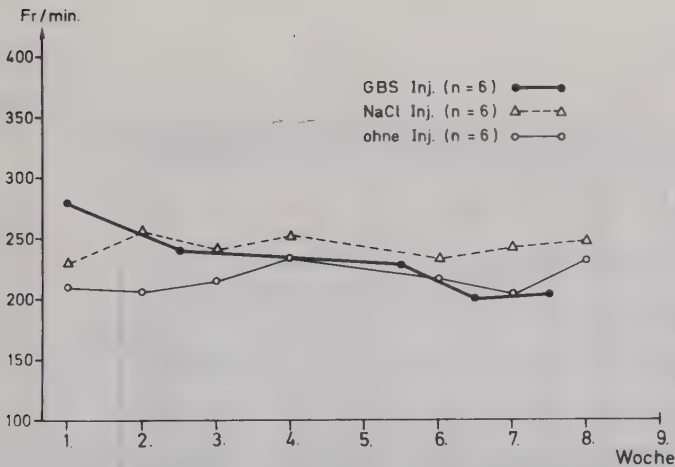


ABBILDUNG 5

Herzfrequenz von Kaninchen bei chronischer GBS-Intoxikation im Vergleich zu den Kontrollwerten mit und ohne NaCl-Injektionen (n = Zahl der Tiere)

3.2.3. Blut

Hämoglobin-Konzentration und Erythrozytenzahl änderten sich nicht (s. Tab.1). Ebenso wurde eine hämorrhagische Diathese durch GBS nicht beobachtet.

3.2.4. Leber

Eine Schädigung der Leber ist unwahrscheinlich, da die Konzentration der Transaminasen im Serum während der chronischen Intoxikation mit GBS gleich blieb und bei der Sektion keine pathologischen Veränderungen gefunden wurden.

3.2.5. Niere

Im Vergleich zu den Kontrollwerten stieg die Kreatininkonzentration bei unverändertem Harnstoff-Stickstoff signifikant an (s. Tab.1) ($p < 0,001$).

TABELLE 1

Versuchstier	Zeit	Hb (g%)	Ery. (Mio)	Hst.-N (mg%)	Kreat. (mg%)	H.säure (mg%)	Glucose (mg%)	SGOT (mU)	SGPT (mU)
A	Beginn	9,1	5,05	14,5	1,0			12,5	15,4
	Ende	10,9	4,58	22,0	1,7	0,32	92	4,2	3,4
B	Beginn	12,0	4,41	27	1,3			4,2	6,2
	Ende	11,0	4,6	26	1,7	0,28	95	5,5	5,5
C	Beginn	12,1	4,73	33	1,1			5,5	5,9
	Ende	10,3	4,6	24	1,7	0,31	106	5,0	7,2
D	Beginn	10,3	5,5	18	1,1			11,1	12,5
	Ende	11,1	4,4	25	1,5	0,29	103	6,2	10,2
G	Beginn	12,1	4,1	16	1,1			5,5	15,7
	Ende	11,7	5,4	25	1,3	0,31	96	9,3	14,7
H	Beginn	11,7	4,7	22	1,0			9,0	16,1
	Ende	9,9	4,4	22	1,8	0,29	139	12,3	14,3
$\bar{x}$	Beginn	11,2 $\pm$ 1,2	4,7 $\pm$ 0,5	22,5 $\pm$ 8,8	1,1 $\pm$ 0,1			9,0 $\pm$ 3,4	12,1 $\pm$ 4
	Ende	10,9 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,4	24 $\pm$ 1,9	1,6 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1 (n = 23)	100 $\pm$ 12 (n = 30)	7,1 $\pm$ 3,1	10,1 $\pm$ 4
$\bar{x}$ Kontrollen (n = 12)		10,8 $\pm$ 0,8	4,6 $\pm$ 0,4	23 $\pm$ 10	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,3 (n = 51)	100 $\pm$ 23,3 (n = 43)	2,5 $\pm$ 3,6	6,2 $\pm$ 3,3 (n = 40)
					$p < 0,001$	$p < 0,005$			

TABELLE 2

	GBS - TIERE	KONTROLLTIERE
LACTAT (mmol/l)	$1,37 \pm 0,79$ (n = 34)	$0,95 \pm 0,41$ (n = 34) $p < 0,005$
PYRUVAT (mmol/l)	$0,107 \pm 0,17$ (n = 34)	$0,110 \pm 0,04$ (n = 35)
L / P	$23,1 \pm 13,2$ (n = 34)	$3,5 \pm 1,93$ (n = 34) $p < 0,0005$
B-HYDROXYBUTYRAT (mmol/l)	$0,24 \pm 0,1$ (n = 23)	$0,27 \pm 0,14$ (n = 34)
AZETOAZETAT (mmol/l)	$0,103 \pm 0,03$ (n = 19)	$0,112 \pm 0,03$ (n = 34)
B-HOB / AzAz	$2,85 \pm 1,2$ (n = 19)	$2,64 \pm 0,72$ (n = 19)

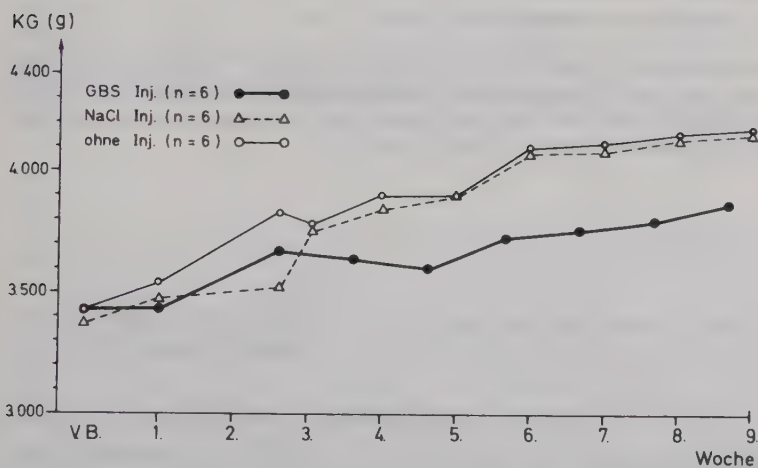


ABBILDUNG 6

Gewichtskurve von Kaninchen bei chronischer GBS-Intoxikation im Vergleich zu den Kontrollwerten mit und ohne NaCl-Injektionen (n = Zahl der Tiere)

Bei der Sektion der Versuchstiere wurde folgender patho-histologischer Nierenbefund festgestellt:

"Staubig-feintropfige bis vakuoläre Schwellung der Tubulusepithelien vorwiegend der proximalen Tubulusabschnitte

Die Glomerula erscheinen durch eine offensichtliche Vermehrung von Mesangiumzellen"

Die gleichen Veränderungen, jedoch in sehr geringem Ausmass, zeigten sich auch bei der Sektion an den Nieren der Kontrolltiere (24, 31).

3.2.6. Stoffwechsel

Im Intermediärstoffwechsel kam es während der chronischen Intoxikation mit GBS zu signifikant erhöhten Konzentrationen von Laktat im Blut ($p < 0,005$). Die Pyruvatkonzentrationen dagegen blieben konstant, ebenso wie die von β -Hydroxybutyrat und Azetoazetat (s. Tab. 2). Der Blutzuckerspiegel blieb während der Intoxikation unbeeinflusst, hingegen fiel die Harnsäurekonzentration im Serum signifikant ab ($p < 0,005$).

3.2.7. Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand nach der Intoxikation war unverändert gut. Im Mittel erreichten die Versuchstiere bei gleichem Ausgangsgewicht nicht das gleiche Endgewicht wie die Kontrolltiere. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ($p < 0,1$) (s. Abb. 6).

4. DISKUSSION

4.1. BEMERKUNGEN ZUR METHODE UND ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

4.1.1. Bestimmung von GBS

Wie Dobbelstein (21) in Übereinstimmung mit Stein, Cohen u. Mitarb. (15) zeigt, stellt das benützte Verfahren (Elution und Sakaguchireaktion) im verwendeten Konzentrationsbereich von GBS eine quantitativ brauchbare Methode dar. Der Zusammenhang zwischen Extinktion und GBS-Konzentration ist gut durch eine Gerade beschreibbar. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9997 (s. Abb. 7) (21).

4.1.2. Klinischer Ausgangspunkt der Intoxikation mit GBS

Bei Patienten mit schwerer chronischer Niereninsuffizienz beträgt die GBS-Konzentration im Serum 2,53 mg% (2,75 mg%) (15, 16, 21). Dobbelstein fand weiter, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen Harnstoff-Stickstoffwerten und GBS-Konzentration im Serum bei chronischer Niereninsuffizienz besteht (22). Danach beträgt bei Harnstoff-Stickstoffwerten zwischen 120 und 190 mg% die mittlere GBS-Konzentration im Serum 3 mg%. Die Intoxikationsdosis wurde im Versuch daher so gewählt, dass die entstehende GBS-Konzentration im Serum der Tiere im Mittel 3 mg% betrug.

4.2. CHRONISCHER INTOXIKATIONSVERSUCH MIT GBS BEI KANINCHEN

4.2.1. GBS und Anämie bei Urämie

Wie Giovannetti und Mitarb. (17) bei Untersuchungen zur Hämolyse bei chronischer Niereninsuffizienz beobachteten, führt GBS, in Konzentrationen von 5-15 mg% normalem Blut zugegeben, zu einer verstärkten Autohämolyse der Erythrozyten in vitro. In diesem Konzentrationsbe-

bereich liegt auch (bei Berücksichtigung des Verhältnisses von Blut zu Serum) die Serumkonzentration von GBS im vorliegenden Intoxikationsversuch. Im Gegensatz zu den in vitro Ergebnissen von Giovannetti wurde bei den Versuchstieren keine Anämie festgestellt und konstante Erythrozytenzahl, wie auch gleichbleibende Hämoglobinkonzentration im Kaninchenblut bestimmt. Man darf daher annehmen, dass GBS auch bei chronischer Niereninsuffizienz nicht zur Entstehung einer Anämie beiträgt.

4.2.2. GBS und hämorrhagische Diathese

Die hämorrhagische Diathese entsteht bei Urämie vermutlich durch kapillartoxische Schäden und gleichzeitige Störungen im Blutgerinnungssystem (34), die sich u. a. in einer verringerten Prothrombinumwandlung bei urämischen Patienten zeigt (18). Horowitz und Mitarb. (18) vermuten den Grund der urämischen Blutungsneigung in einer gehemmten Aktivierung des Thrombozytenfaktors 3, die diese Autoren in vitro beobachten konnten. Den gleichen hemmenden Effekt auf die Aktivierung wie urämisches Plasma hatte bei diesen Untersuchungen auch GBS in einer relativ hohen Konzentration von 3,5 mg% und mehr. Horowitz nimmt daher an, dass GBS diesen Hemmungsfaktor im urämischen Plasma darstellt. Im vorliegenden Tierversuch konnten jedoch keine weiteren Beweise für diese Annahme erbracht werden. Es kam bei den Versuchstieren zu keiner hämorrhagischen Diathese.

4.2.3. GBS und periphere Neuropathie bei Urämie

Klinisch und histopathologisch sind sich urämische Neuropathie und die durch Thiaminmangel hervorgerufene Beri-Beri-Neuropathie auffallend ähnlich (19). Thiaminmangelerkrankungen, wie z. B. die genannte Beri-Beri-Neuropathie, lassen sich nur zum Teil dadurch erklären, dass Thiamin in seiner energiereichen phosphorylierten Form (Thiaminpyrophosphat) als Coenzym an wichtigen Stoffwechselreaktionen beteiligt ist (33). Fehlt Thiaminpyrophosphat als Coenzym, so kommt es u. a. im Kohlenhydratstoffwechsel zu einer verminderten Aktivität der Transketolase. Lonergan, Lange und Mitarb. (19) fanden bei urämischen Patienten in vitro eine gehemmte Aktivität der Erythrozytentransketolase, obwohl bei den untersuchten Fällen kein Thiaminmangel nachgewiesen werden konnte. Diese Autoren vermuten daher, dass eine Hemmung des Apoenzyms Transketolase bei der von Thiaminpyrophosphat als Coenzym

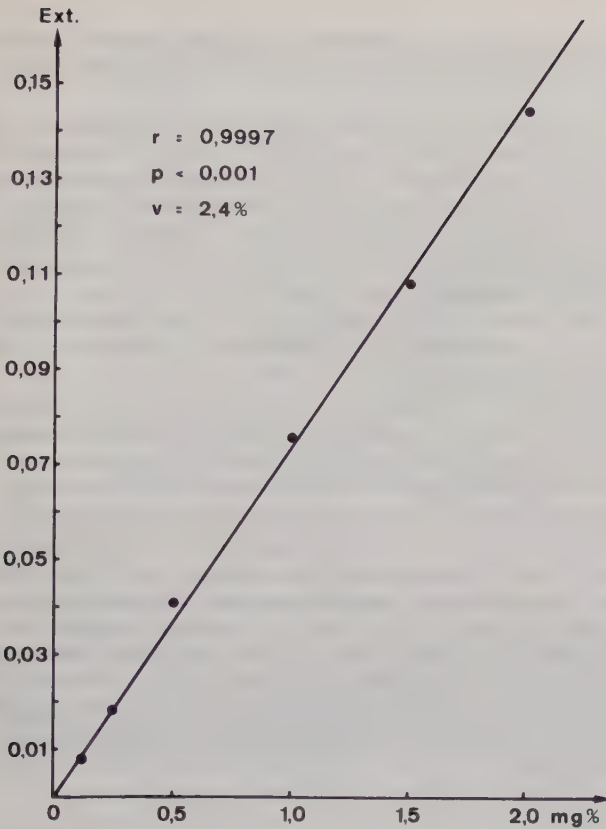


ABBILDUNG 7

Eichgerade zur quantitativen Bestimmung von GBS mit einer modifizierten Sakaguchireaktion

abhängigen Transketolasereaktion für die Entwicklung einer Neuropathie bei Urämie verantwortlich ist. Die Hypothese von Lonergan und Mitarb. besteht nun darin, dass die urämische Neuropathie nicht durch einen Thiaminmangel, sondern durch Hemmung der Transketolase, die entsprechend auch bei Thiaminmangel ihre Aktivität als Apoenzym einbüßt, hervorgerufen wird. Auf der Suche nach den Transketolase hemmenden Faktoren im urämischem Plasma beobachteten diese Autoren, dass GBS denselben qualitativen Effekt einer Transketolasenhemmung

in den Erythrozyten wie urämisches Plasma hat (19). Gegen eine Hemmung der Transketolase durch GBS sprechen jedoch Untersuchungen von Dobbstein (25).

Bei Kaninchen kommt es wie beim Menschen durch Thiaminmangel zu einer Beri-Beri-Neuropathie, die sich peripher in einer Polyneuritis der sensiblen und motorischen Nerven zeigt (35). Bei unseren Versuchstieren trat keine Beeinträchtigung der motorischen Funktion des n. ischiadicus bzw. n. tibialis und der sensiblen Afferenzen des m. plantaris auf. Eine Beri-Beri-Neuropathie ist deshalb auszuschliessen. Dieses Ergebnis kann auf folgende zwei Arten erklärt werden:

1. GBS hemmt bei Kaninchen die Transketolase nicht und es entsteht deshalb (nach der Hypothese von Lonergan) keine Neuropathie.
2. GBS hemmt die Transketolase bei Kaninchen, aber die Hypothese von Lonergan trifft nicht zu und es kommt, wie in 1., zu keiner Neuropathie bei den Versuchstieren.

Für 1. sprechen die Untersuchungen von Dobbstein (25), der eine Transketolase-Hemmung durch GBS in Humanblut nicht nachweisen konnte. Für 2. spricht eventuell die Erniedrigung der Herzfrequenz durch GBS. Bei der Ratte ist ein solche Erniedrigung durch Thiaminmangel bekannt (20). Da neben der Erniedrigung der Herzfrequenz bei den Versuchstieren keine anderen Beri-Beri-Symptome beobachtet wurden, die für eine Hemmung der Transketolase sprechen, erscheint die erste Möglichkeit wahrscheinlicher (s. auch 4.3.2.2.).

Unabhängig von einer möglichen Hemmung der Transketolase kommt GBS als Neurotoxin bei Urämie nach den Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich nicht in Frage.

4.2.4. Stoffwechselveränderungen durch GBS in ihrer pathogenetischen Bedeutung für die Urämie

4.2.4.1. Erhöhung der Laktatkonzentration

Bei den Versuchstieren erhöhte sich die Laktatkonzentration im Blut, die Konzentration an Pyruvat blieb konstant. Im Gegensatz dazu fanden Galloway und Morgan (36) bei urämischen Patienten erhöhte Pyruvatwerte und konstante Laktatkonzentrationen. Dieser Widerspruch ist durch die vorliegenden Versuche nicht erklärbar.

4.2.4.2. Erniedrigung der Harnsäurekonzentration

Sekundäre Gicht wird bei chronischer Niereninsuffizienz selten beobachtet (37, 38). Im Gegensatz zu anderen Rest-N-Faktoren ist die Harnsäurekonzentration im Serum nur mässig erhöht (37). Nach Mertz (37) nimmt bei chronischer Niereninsuffizienz die sog. tubuläre Rejektionsfraktion für Harnsäure zu, so dass trotz Abnahme des Glomerulusfiltrates ein normale Harnsäureausscheidung resultiert. Andere Autoren fanden eine abnorm niedrige Harnsäureproduktion (39), wie auch eine erhöht extrarenale Elimination von Harnsäure (38, 39) bei Urämie.

Im chronischen Intoxikationsversuch mit GBS wurde bei den Versuchstieren eine Erniedrigung der Harnsäurekonzentration festgestellt. GBS hat daher möglicherweise auch bei chronischer Niereninsuffizienz einen Einfluss auf die Höhe der Harnsäurekonzentration im Serum.

4.2.5. GBS und Nephrotoxizität bei Urämie

Eine Nierenschädigung durch GBS bei Kaninchen ist im vorliegenden Tierversuch nicht sicher nachzuweisen, da auch bei allen Kontrolltieren eine geringe Nierenschädigung festgestellt wurde (s. 4.3.2.3.). Eine Aussage über die Wirkung von GBS auf die Nieren urämischer Patienten ist deshalb nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2.6. Abschliessende Bemerkung

Soweit sich tierexperimentelle Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen, führt GBS bei schwerer chronischer Niereninsuffizienz nicht zur Entstehung der Symptome Anämie und periphere Neuropathie. Möglicherweise hat GBS jedoch einen Einfluss auf die Höhe der Harnsäurekonzentration im Serum bei Urämie.

4.3. CHRONISCHE TOXIZITÄT VON GBS BEI KANINCHEN IM VERGLEICH ZU ANDEREN GUANIDINVERBINDUNGEN

4.3.1. Allgemeine Aussagen zum Toxizitätsvergleich

Es zeigten sich im Verlauf des Versuches keine Vergiftungserscheinungen, wie sie von den Guanidinverbindungen Guanidin und Methylguanidin vor allem bei akuten Versuchen bekannt sind (1, 4, 6, 7, 8, 9, 10). Die Wirkung von GBS im vorliegenden Versuch kann daher eher mit der Wirkung eines "Pharmakons" verglichen werden. Dieses Ergebnis über die Toxizität von GBS steht auch im Einklang mit den akuten Intoxikationsversuchen anderer Autoren (40, 16) bei Ratten. Die Autoren konnten trotz sehr hoher GBS-Dosen keine Vergiftungssymptome beobachten.

4.3.1.1. "Entgiftung" von GBS durch die Molekülstruktur

Vergleicht man die Dosis an Methylguanidin des chronischen Intoxikationsversuchs von Giovannetti bei Hunden (4) mit der GBS-Dosis der vorliegenden Versuche, so ergibt sich ein Verhältnis von etwa 3 : 1 der in diesen Dosen enthaltenen Guanidinogruppen (Berechnung s. Anhang). Dies bedeutet, dass Giovannetti nur die dreifache Menge an Guanidinogruppen applizierte und damit Vergiftungserscheinungen hervorrief, wie sie ähnlich bei der akuten Intoxikation mit Guanidin von Mason (1) beobachtet wurden. Auch der Tod der Versuchstiere erfolgte innerhalb kurzer Zeit, nämlich nach 9-19 Tagen. Vergleicht man weiter die Dosis der Versuche von Karr und Mitarb. (30) zur chronischen Toxizität von Synthalin (Dekamethylendiguandidindihydrochlorid) mit der GBS-Dosis des vorliegenden Versuchs, so ergibt sich ein Verhältnis von 1 : 50 (s. Anhang); d.h. Karr konnte bei Hunden mit einer 50-fach geringeren Menge an Guanidinogruppen Vergiftungserscheinungen wie schweren Leber- und Nierenschaden und den Tod der Tiere nach 6-8 Wochen herbeiführen. Aus diesen beiden Vergleichen kann man schließen, dass die Toxizität der diesen Verbindungen gemeinsamen Guanidinogruppe abhängig ist von der Struktur des Molekülrestes. Bei GBS scheint daher eine "entgiftende" Wirkung des Molekülrestes auf die Guanidinogruppe vorzuliegen. Dies kann an einer Ladungsverschiebung durch die Carboxylgruppe(n) liegen. Eine Bestätigung dieser Hypothese kann in der geringen Toxizität (4, 10) der Stoffwechselprodukte Arginin, Kreatin, Kreatinin und Guanidinoessigsäure gese-

hen werden. Diese körpereigenen Stoffe besitzen wie GBS eine Guanidino- und Carboxylgruppe. Für diese Hypothese spricht auch die fehlende akute Toxizität von GBS (16, 40).

4.3.1.2. Pharmakologische Wirkungen von GBS durch die Guanidinogruppe

Die Ergebnisse des chronischen Intoxikationsversuchs mit GBS lassen vermuten, dass die spezifische Wirkung der Guanidinogruppen bei GBS nicht völlig verschwindet. Dies scheint vor allem für die Wirkung im extramitochondralen Raum des Stoffwechsels und für die Wirkung am Herzen möglich zu sein.

4.3.2. Spezielle pharmakologische Wirkungen von GBS im chronischen Intoxikationsversuch bei Kaninchen im Vergleich mit anderen Guanidinderivaten

4.3.2.1. GBS und Blutzuckerspiegel

Es wurde keine Wirkung von GBS auf den Blutzuckerspiegel der Versuchstiere festgestellt. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Cohen und Mitarb., die einen Einfluss von GBS auf den Kohlehydratstoffwechsel nicht nachweisen konnten (16). GBS scheint daher im Gegensatz zu Guanidin und anderen Guanidinderivaten, wie Synthalin oder den Biguanidderivaten (orale Antidiabetika), einen guanidinogruppen-spezifischen Effekt einer Blutzuckersenkung (16) nicht mehr zu besitzen.

4.3.2.2. GBS und Herzfrequenz

Als einzige Veränderung am Herz, soweit untersucht, wurde im Verlauf des Versuchs eine Abnahme der Herzfrequenz festgestellt, jedoch keine Versuche mit Atropin unternommen. Wahrscheinlich wirkt GBS wie andere Guanidinderivate (10) spezifisch durch die Guanidinogruppe auf die Herzaktion. Die Ergebnisse von Minot bei der akuten Intoxikation von Hunden mit Guanidin (8) und die Ergebnisse von Potter und

Stoland (41) bei Untersuchungen über den Einfluss von Methylguanidin auf den Vagus sprechen dafür, dass die Erniedrigung der Herzfrequenz durch GBS auf eine acetylcholin- oder physostigminartige (42) Wirkung von GBS zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Schmid (43), in denen kein acetylcholinartiger Effekt am Kaninchendarm durch GBS nachgewiesen werden konnte.

Weiter steht der Befund einer erniedrigten Herzfrequenz im Intoxikationsversuch mit GBS im Gegensatz zu den Beobachtungen Giovannettis (4), der bei chronischer Intoxikation mit Methylguanidin Tachykardie und Arrhythmie fand und in 3 von 24 Fällen histologisch degenerative Veränderungen des Myokards nachwies. Dies spricht für eine starke chronische Toxizität von Methylguanidin am Herzen im Gegensatz zur Wirkung von GBS.

4.3.2.3. GBS und Nephrotoxizität

Eine vakuoläre Tubulusdegeneration mit sekundärer interstitieller Nephritis (26) mit entsprechender Kreatininerhöhung im Serum weist auf eine toxische Wirkung der GBS an der Niere hin. Verstärkt wird dieser Hinweis dadurch, dass das Guanidinderivat Synthalin bei Hunden eine histologisch sehr ähnliche Nierenveränderung bei chronischer Intoxikation hervorruft (30) und dass auch von anderen Guanidinderivaten eine nierenschädigende Wirkung bekannt ist (44). Da aber bei allen Kontrolltieren dieselbe Art der Nierenschädigung auftrat, jedoch in einem wesentlich geringeren Ausmass, "geringe Abweichungen von der Norm" (24, 31), muss angenommen werden, dass unter Umständen dieser Nierenschädigung eine Stallinfektion zu Grunde liegt und GBS einen zusätzlichen begünstigenden Faktor für eine Nierenschädigung darstellt.

4.3.2.4. GBS und oxydative Phosphorylierung

Guanidin hemmt die oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien (28, 29). Hollunger (28) stellte für die Guanidinderivate Methylguanidin, asym. Dimethylguanidin und Synthalin diese Wirkung in ähnlicher Weise, jedoch nicht in gleicher Stärke fest. Durch Methylierung verliert Guanidin

an Wirksamkeit (29, 28). Weitere von Hollunger untersuchte Guanidinverbindungen (Arginin, Kreatin, Kreatinin und Glykozyamin) hatten keinen Effekt auf die oxydative Phosphorylierung.

Unveränderte Konzentrationen von Azetoazetat und β -Hydroxybutyrat im Blut der Versuchstiere zeigen, dass GBS keinen Einfluss auf das Redoxpotential des intramitochondrialen Raumes und entsprechend auf die oxydative Phosphorylierung hat.

Der Unterschied in der Hemmung der oxydativen Phosphorylierung zwischen Guanidin und GBS könnte auf die geringen GBS-Konzentrationen im Verhältnis zu den hemmenden Konzentrationen von Hollunger zurückzuführen sein. Ein weiterer Grund für diesen Unterschied kann in der Molekülstruktur liegen. Die Struktur von GBS gleicht mehr den auch in den Versuchen von Hollunger nicht wirksamen Guanidinverbindungen.

4.3.2.5. GBS und Laktatspiegel

In Untersuchungen von Dickens (45) steigert Guanidin wie Synthalin in vitro die Laktatproduktion im Hirngewebe unter aeroben Bedingungen. Auch in vivo fand Minot (46) und auch McFate (44) eine Erhöhung des Laktatspiegels bei Guanidin-Intoxikation. Im chronischen Intoxikationsversuch mit GBS konnte diese guanidinspezifische Wirkung ebenfalls bei den Versuchstieren beobachtet werden. Eine Erklärung für diesen Stoffwechseleffekt von Guanidinverbindungen und speziell von GBS ist nicht bekannt. Zusammen mit der unveränderten Pyruvatkonzentration im chronischen Intoxikationsversuch weist dies nur auf eine Negativierung des Redoxpotentials im extramitochondrialen NAD-NADH System hin (22, 47) (s. auch 4.3.2.4.).

4.3.2.6. GBS und Harnsäurespiegel

Die für Guanidin bekannte Hemmung des Enzyms Xanthin-oxydase in vitro (48) liess sich in Untersuchungen von Dobbelstein (21) für GBS nicht nachweisen. Die Erniedrigung der Harnsäurekonzentration bei den Versuchstieren beruht deshalb vermutlich nicht auf einer Hemmung der Xanthin-oxydase. Andere Tierversuche sind nicht bekannt, in denen

ein Einfluss von Guanidin oder einer Guanidinverbindung auf den Harnsäurespiegel festgestellt wurde. Unter Umständen hat GBS in diesem Fall eine pharmakologische Wirkung, die nicht an ihre Zugehörigkeit zu den Guanidinverbindungen geknüpft ist.

4.3.2.7. GBS und Nervenleitgeschwindigkeit

Im Gegensatz zu den Versuchen Giovannettis (4), der bei chronischer Intoxikation mit Methylguanidin 9-15 Tage nach Intoxikationsbeginn einen Rückgang der NLG des n. ischiadicus bzw. des n. tibialis mit schweren, degenerativen Veränderungen bei Hunden beobachtete, wurde eine neurotoxische Eigenschaft von GBS, jedenfalls nicht in der Konzentration wie bei Urämie (3 mg%), festgestellt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei die geringere Dosis an Guanidinogruppen oder Speziesunterschiede eine Rolle spielen.

4.3.2.8. GBS und Anämie

Eine hämolytische Anämie, wie sie Giovannetti sowohl bei chronischer Intoxikation mit Methylguanidin als auch bei Kreatinin beobachtete (4), trat im vorliegenden Versuch durch GBS nicht auf.

GBS zeigt sich auch in dieser Richtung als nicht toxische Guanidinverbindung, zumindest nicht bei der untersuchten Serumkonzentration von GBS. Speziesunterschiede sind nicht auszuschliessen.

4.4. ALLGEMEINE DISKUSSION

Nach den Ergebnissen des Tierversuches scheint GBS nicht, wie Cohen es formuliert hat, "a primary candidate for an uremic toxin" zu sein. Der chronische Intoxikationsversuch mit GBS bei Kaninchen prüft diese Substanz aber nur als potentiell toxische Einzelkomponente im gesunden Organismus, so dass mögliche Kombinationseffekte bei Urämie nicht auszuschliessen sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein chronischer Intoxikationsversuch mit Guanidinbernsteinsäure (GBS) bei Kaninchen beschrieben. Sechs Tieren wurden neun Wochen lang alle 4-5 Stunden 17 mg GBS/kg KG subkutan injiziert, wobei ein konstanter, mittlerer Serumspiegel an GBS von 3 mg%, wie er bei Urämie beobachtet wird, aufrechterhalten wurde.

Der Allgemeinzustand der Tiere war gut. Vergiftungssymptome traten nicht auf, eine toxische Nierenschädigung ist fraglich. Herzfrequenz und Harnsäurekonzentration nahmen ab, die Lactatkonzentration im Blut erhöhte sich, hingegen blieb die Nervenleitgeschwindigkeit unverändert.

Nach den Ergebnissen führt chronische Intoxikation mit GBS bei Kaninchen nicht zur Entstehung der Symptome Anämie, Blutungsneigung und Neuropathie im peripheren Nervensystem, wie sie bei Urämie auftreten. Ein ursächlicher Zusammenhang von GBS zur relativ niedrigen Harnsäurekonzentration bei Urämie ist möglich.

Die pharmakologische Wirkung von GBS wird im Zusammenhang mit anderen Guanidinverbindungen diskutiert. Die Möglichkeit einer "Entgiftung" durch die Molekülstruktur wird aufgezeigt.

6. ANHANG

Vergleich der Dosen an Guanidinogruppen bei den Versuchen von Giovannetti (4) mit Methylguanidin, von Karr (30) mit Synthalin und in der vorliegenden Arbeit mit GBS:

Substanz	MGW	Anzahl der Guanidino- gruppen	Tagesdosis (mg/kg KG)	Guanidino- gruppen (mMol/die)
GBS	175	1	90	0,5
Methylguanidin	73	1	90-120	1,5
Synthalin	256	2	1-2	0,001

MGW = Molekulargewicht

Als Verhältnis für den Guanidinogruppengehalt der drei Versuche ergeben sich folgende Werte:

Dosis von Giovannetti : Dosis der vorliegenden Arbeit = 3 : 1
 Dosis von Karr : Dosis der vorliegenden Arbeit = 1 : 50

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Mason M. F., H. Resnik, A. S. Minot, J. Rainey, C. Pilcher und T. H. Harrison:
Mechanism of experimental uremia
Archives of Int. Med. 60, 312-336 (1937)
2. Harrison T. R., M. F. Mason:
The pathogenesis of the uremic syndrome
Medicine 16, 1-44 (1937)
3. Frank E. R., Stern:
Über den Angriffspunkt des Guanidins und Methylguanidins bei der Erzeugung motorischer Reizerscheinungen (Guanidin-Kokain-Antagonismus)
Archiv f. exp. Pathologie und Pharmakologie 90, 168-179 (1921)
4. Giovannetti S., M. Biagini, P. L. Balestri, R. Navalesi, P. Giagnoni, A. de Matteis, P. Ferro-Milone und C. Perfetti:
Uraemia-like syndrome in dogs chronically intoxicated with methylguanidine and creatinine
Clin. Sci. 36, 445 (1969)
5. Myers V. C., M. S. Fine:
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 11, 132 (1914)
6. Minot A. S., M. Keller:
Effect of continous venoclysis in dogs with guanidine intoxication
J. P. E. T. 60, 45-55 (1937)
7. Minot A. S.: A comparison of the effect of calcium and of atropine and scopolamine on the plasma loss and on the general symptoms of guanidine intoxication
J. E. P. T. 65, 243-252 (1939)
8. Minot A. S.: A study of the mechanisms involved in the loss of plasma in guanidine intoxication and in the prevention of such loss by atropine and by calcium
J. P. E. T. 65, 253-267 (1939)
9. Minot A. S.: The circulatory failure associated with guanidine intoxication
J. P. E. T. 60, 32-44 (1936)

10. Sollmann T.: Manual of Pharmacology, 6th Edt., 1943
11. Andes J.E., W. Morgantown, Ch.R. Linegar und V.C. Myers:
Blood Guanidine in Nitrogen Retention and Hyper-
tension
J. Lab. & Clin. Med. 22, 1209 (1937)
12. Andes J.E. und V.C. Myers:
Colorimetric Estimation of Guanidine-like Sub-
stances in the Urin
Journal of Biological Chemistry 118, 137 (1937)
13. Bonas J.E., B.D. Cohen und S. Natelson:
Separation and Estimation of Certain Guanidino
Compounds. Application to Human Urine
Microchemical Journal 7, 63 (1963)
14. Natelson S., I. Stein und J. E. Bonas:
Improvements in methods of separation of guani-
dino organic acids by column chromatography:
isolation and identification of guanidinosuccinic
acid from human urine
Microchem. J. 8, 371 (1964)
15. Stein I. M., B. D. Cohen und R. S. Kornhauser:
Guanidinosuccinic acid in renal failure, experimen-
tal azotemia and inborn errors of the urea cycle
New Engl. J. Med. 280, 926 (1969)
16. Cohen B. D.: Guanidinosuccinic acid in uremia
Archives of Internal Medicine 126, 846 (1970)
17. Giovannetti S., L. Cioni, P. L. Balestri und M. Biagini:
Evidence that guanidines and some related com-
pounds cause haemolysis in chronic uraemia
Clin. Sci. 34, 141 (1968)
18. Horowitz H. I., B. D. Cohen, P. Martinez und M. F. Papayouanou:
Defective ADP-induced platelet factor 3 activation
in uremia
Blood 30, 331 (1967)
19. Lonergan E. T., M. Semar und K. Lange:
Transketolase Activity in uremia
Archives of Internal Medicine 126, 851 (1970)

20. Dobbelstein H., J. Grunst, Ch. Pfadler, M. Schmidt, G. Schubert, M. Weinzierl und H. H. Edel:
Guanidinbernsteinsäure und Urämie
Klin. Wschr. 48, (1970)
21. Dobbelstein, H.:
Guanidinbernsteinsäure und Urämie
Habilitationsschrift, München 1971
22. Dobbelstein H., J. Grunst, Ch. Pfadler, G. Schubert und H. H. Edel:
Chronische Intoxikation von Kaninchen mit Guanidinbernsteinsäure
Symp. dt. Ges. f. Nephrol., Tübingen 1970
23. Dobbelstein H., B. Altmeyer, H. H. Edel, H. J. Gurland, R. Müller, H. Pichlmaier und A. Jabour:
Periphere Neuropathie bei chronischer Niereninsuffizienz, bei Dauerdialysebehandlung und nach Nierentransplantation
Med. Klin. 63, 616 (1968)
24. Dobbelstein H.:
Persönliche Mitteilung
25. Dobbelstein H., H. H. Edel, M. Schmidt, G. Schubert und M. Weinzierl:
Guanidinbernsteinsäure und Urämie
Klin. Wschr. 49, 348 (1971)
26. Grunst J.:
Über den Anoxie-Zyklus bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
Dissertation München 1967
27. Grunst J. und H. Dobbelstein:
Persönliche Mitteilung
28. Hollunger G.: Guanidines and oxidative phosphorylations
Acta Pharmacologica et Toxicologica 11, Supplementum 1 (1955)
29. Chance B. und G. Hollunger:
Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria
The Journal of Biol. Chemistry 238 (1963)

30. Karr W.G., W. P. Belk und O. H. Petty:
The toxicity of synthalin
J. P. E. T. 36, 611 (1929)
31. Dahme: Sektionsbefund,
Tierpathologisches Institut der Universität Mün-
chen
32. Kuschinsky G. und H. Lüllmann:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1970)
33. Karlson P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1967)
34. Sturm A.: Grundbegriffe der inneren Medizin und Neurologie
G. Fischer Verlag, Stuttgart (1968)
35. Reid J. M., L. Hove, B. F. Braucher und O. Mickelsen:
Thiamine Deficiency in Rabbits
J. Nutr. 80, 381 (1963)
36. Galloway R. E. und J. M. Morgan:
Serum Pyruvat and Lactate in Uremia
Metabolism 13, 818 (1964)
37. Mertz D. P.: Gicht und Hyperuricämie
Archiv für Klinische Medizin 212, 143 (1966)
38. Clarkson B. A.:
Uric acid related to uraemic symptoms
Proc. Eur. Dialysis Transpl. Ass. 3, Amsterdam,
Excerpta Medica
39. Richet G.: Some aspects of uric acid metabolism in chronic
renal failure
40. Takahara K., S. Nakanishi und S. Natelson:
Cleavage of canavaninosuccinic acid by human liver
to form guanidinosuccinic acid, a substance found
in the urine of uremic patients
Clin. Chem. 15, 397 (1969)

41. Potter W. F. und O. O. Stoland:
The effect of methylguanidine salts upon some of
the autonomic nerves of the dog
Am. J. Physiol. 99, 598 (1932)
42. Grollman A.: Pharmakology and Therapeutics,
Phil. Lee and Febiger, 6th Edt. (1965)
43. Schmid A.: Persönliche Mitteilung
44. McFate R. P.: Guanidine and its relationship to muscular dystrophy
Clin. & Lab. Chemistry 28, 50 (1942)
45. Dickens F.: The action of guanidines and amidines on the pa-
steur effect
Biochem. J. 33, 2017 (1939)
46. Minot A. S.: The mechanism of the hypoglycemia produced by
guanidine and carbontetrachlorid poisoning and its
relief by calcium medication
J. Pharmacol. 43, 295 (1939)
47. Bücher Th., M. Klingenberg:
Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organi-
sation
Angew. Chemie 70, 552 (1958)
48. Rajagopalan K. V., J. Fridovich und Ph. Handler:
Competitive Inhibition of Enzyme Activity by Urea
J. of Biol. Chemistry 236/II, 1059 (1961)

Diese Arbeit wurde im Rahmen der Untersuchungen über Guanidinbernsteinsäure von Herrn Dr. H. Dobbeltstein und unter seiner wissenschaftlichen Leitung durchgeführt. Für die gewährte Unterstützung und die persönliche Förderung möchte ich Herrn Dr. Dobbeltstein sehr herzlich danken.

Für die Überlassung des Themas gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. H. H. Edel und Herrn Dr. H. Dobbeltstein, sowie für die biochemischen Stoffwechseluntersuchungen Herrn Dr. J. Grunst, Frau Dr. Burger und die Herren Dr. Fateh und Dr. Lamerz gewährten stets freundliche Hilfe im Labor und an der Rechenmaschine. Ebenfalls bedanke ich mich herzlich für die Mitarbeit von Frau G. Schubert.

Die Sektion der Versuchstiere und die Anfertigung sowie die Auswertung der histologischen Präparate wurden freundlicherweise von dem Tierpathologischen Institut der Universität München, Prof. Dahme, durchgeführt.

LEBENS LAUF

Am 2.4.1947 wurde ich als einzige Tochter der Zahnärztin Dr. Gisela Kraus und des Elektroingenieurs Dr. Alexander Kraus in München geboren. Vier Jahre lang besuchte ich die Volksschule an der Werdenfelsstrasse, anschliessend neun Jahre das Städt. Luisengymnasium in München.

Im Herbst 1966 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München. Nach fünf Semestern legte ich das Physikum ab, nach sieben klinischen Semestern beendete ich am 19.12.1972 das Staatsexamen mit sehr gutem Erfolg.

Seit August 1968 bin ich mit Herrn Dipl. -phys. Werner Pfadler verheiratet.

